

Research Report

Karakterisasi stem cell pulpa gigi sulung dengan modifikasi enzim tripsin

(The characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth using trypsin enzym)

Tri Wijayanti Puspitasari, Tania Saskianti, dan Udijanto Tedjosongko

Departemen Ilmu Kedokteran Gigi Anak
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
Surabaya - Indonesia

ABSTRACT

Background: Now a days, treatment in dentistry, using tissue regeneration that based on the stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED), grows rapidly. For several reason, the isolated and cultured SHED is difficult to be applied in Indonesia, therefore the modification is needed. This difficulties were caused by the pulp anatomy, the heterogeneous populations in the pulp chamber and the limitations of tools and materials at the laboratory. **Purpose:** This research was aimed to examine that the modifications of isolation and culture technique of SHEDs for characterization by using the marker of CD105. **Methods:** The research was experimental laboratory with the cross sectional design. The samples were the human exfoliated deciduous teeth from the children patients of Pediatric Dentistry Department of Universitas Airlangga Dental Hospital which matched the criteria. Dental pulps were isolated and cultured by using the modifications of Trypsin enzymes. **Results:** The healthy SHEDs could be produced from the modifications of isolation and culture and positively shown the expression of marker CD105 which were indicated by the fluorencent microscope. **Conclusion:** SHED which isolated and cultured by using the modified techniques, positively characterized by using marker CD105.

Key words: SHED, modifications, isolated and culture techniques, characterization

ABSTRAK

Latar Belakang: Pengobatan kedokteran gigi berkembang dengan pesat terutama di bidang regenerasi jaringan berbasis Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED). Di Indonesia, isolasi dan kultur SHED sulit sehingga perlu dilakukan modifikasi. Kendala ini muncul karena jaringan pulpa yang kecil, heterogen dan keterbatasan alat dan bahan di laboratorium. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk meneliti modifikasi pada cara isolasi dan kultur SHED untuk karakterisasi menggunakan maker CD105. **Metode:** Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan cross sectional. Sampel penelitian adalah gigi sulung dari pasien anak di Klinik Kedokteran Gigi Anak, Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Airlangga yang telah memenuhi kriteria. Pulpa gigi diisolasi dan dikultur dengan modifikasi enzim Trypsin. **Hasil:** SHED yang sehat hasil dari modifikasi teknik isolasi dan kultur positif menunjukkan ekspresi marker CD105 dengan berfluoresensi berwarna hijau dilihat melalui mikroskop fluoresen. **Simpulan:** SHED yang dikultur dan diisolasi dengan teknik modifikasi positif dikarakterisasi dengan marker CD105.

Kata kunci: SHED, modifikasi, teknik isolasi dan kultur, karakterisasi

Korespondensi (*correspondence*): Tri Wijayanti Puspitasari, Departemen Ilmu Kedokteran Gigi Anak, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl. Mayjend. Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya, 60132, Indonesia. E-mail: salsabilah_tw@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Pengobatan kedokteran gigi berkembang dengan pesat terutama di bidang regenerasi jaringan berbasis *stem cell*. *Stem cell* dapat diisolasi dari pulpa gigi sulung manusia yang akan tanggal dan disebut *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous* (SHED). *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous* (SHED) mempunyai kelebihan apabila dibandingkan dengan *stem cell* jenis lain karena berasal dari jaringan yang muda sehingga mampu berdiferensiasi menjadi jenis sel yang lebih beragam, potensi proliferasi dan regenerasinya lebih besar.^{1,2}

Pulpa gigi sulung manusia secara histologis terdiri dari tiga bagian, yaitu odontoblas, *cell free zone*, dan *cell rich zone*. *Cell rich zone* yang diisolasi dan dikultur dari pulpa gigi sulung manusia terdiri dari berbagai macam populasi sel. Beberapa peneliti menemukan komponen sel-sel yang terdapat pada bagian pulpa tersebut antara lain fibroblast, sel-sel pertahanan, serat-serat kolagen, substansi dasar, pembuluh darah, limfatik, dan ujung saraf sensorik. Perbandingan jumlah *stem cell* dari berbagai macam populasi sel lain yang ada di pulpa gigi sulung manusia adalah 1 : 1000. Jumlah populasi pulpa gigi sulung yang heterogen menyebabkan *stem cell* sulit untuk diisolasi, dikultur dan dikarakterisasi.³

Beberapa peneliti menggunakan teknik yang berbeda untuk dapat mengisolasi dan mengkultur *stem cell* dari pulpa gigi sulung yang heterogen. Peneva dkk.⁴ menggunakan enzim *colagenesis* tipe V selama lima sampai tujuh hari di dalam *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM) untuk memisahkan populasi jaringan heterogen menjadi sel tunggal sehingga didapatkan inti sel pulpa gigi sulung yang mengandung *stem cell*.⁵ menggunakan enzim *colagenase* tipe I dan tipe II dengan *termolysin* sebagai *neutral protease* selama 40 menit dalam inkubator pada atmosfer suhu 37°C dan CO₂ 5%. Nikolic *et al.*⁶ menggunakan enzim *colagenase* tipe I yang disuplementasi *Fetal Bovine Serum* (FBS) selama 45 menit di dalam inkubator pada tahap isolasi dan kultur *stem cell* hari pertama. Pada hari berikutnya, jika *stem cell* berhasil mengalami proliferasi dan *confluent*, enzim *trypsin* digunakan untuk proses subkultur.

Penelitian kultur dan isolasi primer *stem cell* pulpa gigi sulung belum berhasil dilakukan di Indonesia. Hal ini disebabkan karena populasi pulpa gigi sulung yang heterogen serta keterbatasan bahan dan alat laboratorium di Indonesia. Oleh karena itu, peneliti melakukan beberapa modifikasi teknik kultur dan isolasi untuk keberhasilan isolasi SHED. Modifikasi teknik kultur dan isolasi yang dilakukan pada penelitian ini, yaitu modifikasi waktu, alat *rotomix* dan enzim *trypsin* tanpa menggunakan enzim *colagenase*. Uji karakterisasi *stem cell* pulpa gigi sulung menggunakan *marker* CD105 sebagai kontrol positif dan CD45 sebagai kontrol negatif dengan teknik imunositokimia.

Penelitian ini bertujuan untuk meneliti modifikasi enzim *trypsin* pada teknik isolasi dan kultur SHED untuk karakterisasi dengan menggunakan *marker* CD105. Hasil

penelitian secara *in vitro* ini selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk bank jaringan dan penelitian-penelitian *stem cell* pulpa gigi sulung yang lain. Pada penelitian jangka panjang, *stem cell* pulpa gigi sulung diharapkan dapat digunakan untuk aplikasi pengobatan kedokteran gigi di bidang regenerasi jaringan dengan sampel penelitian yang mudah didapat di Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *cross sectional*. Sampel penelitian ini adalah gigi sulung yang diekstraksi dari pasien anak di Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Airlangga. Modifikasi teknik isolasi dan kultur pulpa dilakukan pada gigi #53 yang diekstraksi dari pasien laki-laki usia 9 tahun disebut sampel pulpa I dan gigi #71 dari pasien laki-laki usia 7 tahun disebut sampel pulpa II serta gigi #81 dari pasien tersebut disebut sampel pulpa III. Gigi sulung pada pasien anak tersebut adalah gigi yang vital, tidak terdapat karies, diekstraksi karena persistensi atau perawatan ortodonsia dan resorpsi tidak melebihi 1/3 akar. Metode pengambilan sampel pada penelitian adalah *purposive sampling*, artinya penentuan sampel mempertimbangkan kriteria-kriteria tertentu berdasarkan tujuan penelitian.

Persiapan penelitian dan pembuatan sediaan pulpa gigi sulung dilakukan di Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Airlangga. Isolasi, kultur dan uji karakterisasi *stem cell* pulpa gigi sulung manusia dilakukan secara *in vitro* di Laboratorium *Stem Cell Institute Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga. Prosedur kerja penelitian, yaitu mensterilisasikan semua alat dan ruangan untuk penelitian, kemudian dilakukan ekstraksi gigi sulung dengan hati-hati sehingga akar gigi tidak mengalami fraktur dan gigi tercabut sempurna.

Gigi yang telah diekstraksi dipotong membujur pada *incisal-apical* menggunakan bur *fissure* kemudian dilakukan pengambilan jaringan pulpa dan segera diletakkan dalam medium *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (Sigma St. Louis, MO, USA) untuk kemudian dibawa ke laboratorium. Di laboratorium, pulpa gigi sulung diletakkan di dalam *rotomix* dan diberi perlakuan dengan enzim *trypsin* 0,25% (PAA Laboratories, Linz, Austria) selama 35 menit untuk memperoleh inti dari jaringan pulpa. Kemudian disentrifuge 2000 rpm selama 5 menit untuk memperoleh *cell pellet* dan memisahkan supernatannya. Setelah itu, suspensi sel dikultur pada medium *dish* ø35 mm yang telah diberi DMEM dan disuplementasi dengan *Fetal Bovine Serum* 20%, 5 ml *L-Glutamine*, 100 U/ml *penicillin-G*, 100 g/ml *streptomycin* dan 100 g/ml *kanamycin* (PAA Laboratories, Linz, Austria) dalam inkubator pada atmosfer suhu 37°C dan CO₂ 5%.⁶

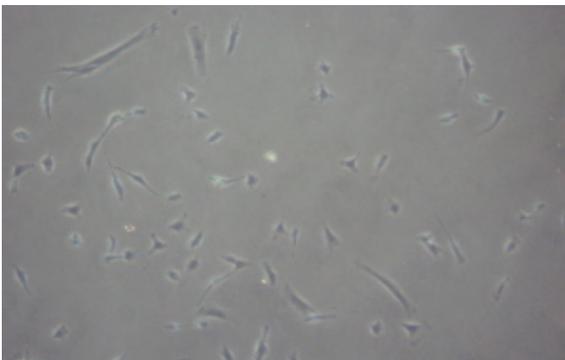
Sel pulpa gigi sulung hasil isolasi dan kultur yang berhasil berproliferasi dikarakterisasi melalui ekspresi *marker* CD105 (Biosource invitrogen, Camarillo, CA)

sebagai kontrol positif dan CD45 (Biosource invitrogen, Camarillo, CA) sebagai kontrol negatif dengan teknik *direct immunocytochemistry-one staining*. Kultur sel dibilas dengan *Phosphate-Buffered Salin* (PAA Laboratories, Linz, Austria) sebanyak 3 kali dan dilakukan *blocking* dengan penambahan larutan *blotto* (PAA Laboratories, Linz, Austria) untuk mencegah terjadinya *nonspecific binding* yang terdiri dari 5% *skim milk* (PAA Laboratories, Linz, Austria) dan ditambahkan larutan *tween 20/0,03%* (PAA Laboratories, Linz, Austria), selanjutnya dibilas lagi dengan PBS sebanyak 3 kali.^{7,8}

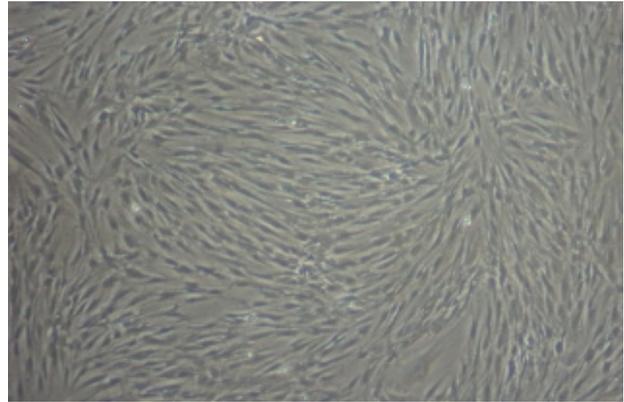
Tahap berikutnya mereaksikan sel pulpa dengan *marker* antibodi CD105 pada satu sisi objek *glass* dan sisi lain dengan *marker* antibodi CD45 kemudian ditutup dengan *deck glass*. Kedua *marker* ini berlabel *Fluorecent isothiocyant* (FITC) yang sudah dilarutkan dalam *blotto* 2 µl/ml ke dalam *well*. Kemudian diinkubasi selama 1 jam di dalam inkubator. Setelah 1 jam dilakukan pencucian ulang dengan PBS sebanyak 3 kali dan diamati melalui mikroskop fluorensen dengan pembesaran 200x di ruang gelap. Populasi sel pulpa gigi sulung yang positif akan berfluoresensi berwarna hijau terhadap *marker* antibodi CD105 dan dikarakterisasi sebagai *Stem Cells Human Exfoliated Deciduous* (SHED).^{7,8}

HASIL

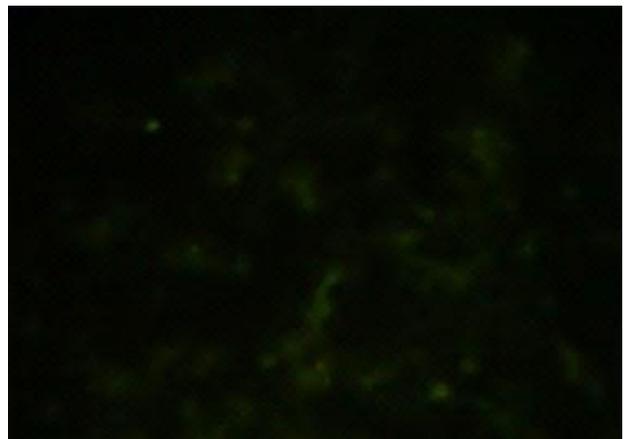
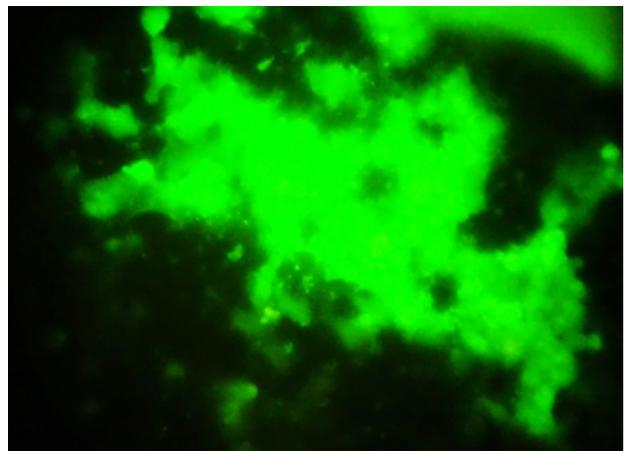
Sebanyak tiga sampel didapat dari pasien anak berusia 7 dan 9 tahun yang datang ke Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Airlangga. Ketiga sampel merupakan gigi yang sesuai dengan kriteria pada metode kerja. Kriteria tersebut ditentukan supaya sampel hasil modifikasi isolasi dan kultur dapat menghasilkan SHED yang sehat sehingga dapat dikarakterisasi dengan *marker* CD105. Ketiga sampel diambil pulpa giginya kemudian pada hari ke-7, sampel pulpa I, II dan III berhasil berproliferasi dengan morfologi berbentuk fusiform untuk pertama kalinya di pasase 0 (Gambar 1). Pada hari ke-20 sel pulpa yang berproliferasi mengalami 80% konfluen dan mulai dibiakkan pada *dish* ø35 mm yang lain di pasase 1. Pada hari ke-28, pasase 4, SHED yang sehat mengalami 4 kali konfluen (Gambar 2).



Gambar 1. Gambaran mikroskopik sampel pulpa I, pasase 1, nampak morfologi sel berbentuk fusiform pada hari ke-7 (tanda panah) (Pembesaran 100x).



Gambar 2. Gambaran mikroskopik sampel pulpa I, pasase 4, nampak sel pulpa yang berproliferasi mengalami 80% konfluen pada hari ke-28 (Pembesaran 100x).



Gambar 3. Gambaran mikroskopik fluorensen sampel pulpa I, hari ke-28, hasil karakterisasi *stem cells*: A) sampel pulpa I nampak positif kuat terhadap *marker* CD105 yakni terjadi fluoresensi atau pendar cahaya berwarna hijau (tanda panah); B) sampel pulpa I nampak negatif terhadap *marker* CD45 yakni tidak terjadi fluoresensi atau pendar cahaya dan sel terlihat gelap (Pembesaran 200x).

Sampel pulpa I gigi sulung yang di subkultur pada pasase 4 dilakukan karakterisasi dengan hasil positif mengandung SHED ditunjukkan melalui fluoresensi atau pendar cahaya berwarna hijau terhadap *marker* CD105 (Gambar 3A) dan tidak terjadi fluoresensi atau pendar cahaya terhadap *marker* CD45 (Gambar 3B) dilihat melalui mikroskop fluoresen pembesaran 200x dengan teknik imunositokimia.

PEMBAHASAN

Menurut Prayogo dan Wijaya⁹ banyak ilmuwan dari berbagai lembaga telah melakukan kultur *stem cell*, masing-masing dengan metode mereka sendiri. *Stem cell* yang ditumbuhkan di berbagai laboratorium dengan berbagai teknik memiliki dua kesamaan, yaitu tumbuh di kultur sebagai sel yang melekat dengan lama hidup tertentu dan memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi. Keberhasilan modifikasi teknik isolasi dan kultur pada penelitian ini dapat dilihat dari SHED yang mampu berproliferasi secara mikroskopik memiliki bentuk fusiform, *fibroblast-like* dan membentuk koloni pada fase pertumbuhan *in vitro*.¹⁰

Penelitian modifikasi teknik isolasi dan kultur SHED yang kami lakukan berbeda dengan penelitian Peneva *et al.*⁴ yang menggunakan enzim *colagenesis* tipe V selama lima sampai tujuh hari di dalam *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM) untuk memisahkan populasi jaringan heterogen menjadi sel tunggal sehingga didapatkan inti sel pulpa gigi sulung yang mengandung *stem cell*. Pada penelitian dengan modifikasi ini, waktu yang digunakan untuk mendapatkan sel tunggal tersebut lebih pendek, yaitu ± 35 menit. Tujuan memperpendek waktu adalah supaya pulpa gigi sulung tidak terkontaminasi mikroorganisme dan berbagai jenis agen lain yang terdapat di ruangan. Faktor kontaminasi tersebut dinilai bisa menghambat pertumbuhan sel dan menyebabkan kegagalan kultur *stem cell* pulpa gigi sulung.

Penelitian dengan modifikasi teknik isolasi dan kultur ini juga berbeda dengan penelitian Perry *et al.*⁵ yang menggunakan enzim *colagenase* tipe I dan tipe II dengan *termolysin* sebagai *neutral protease* selama 40 menit dalam inkubator pada atmosfer suhu 37⁰ C dan CO₂ 5%. Pada penelitian dilakukan modifikasi alat *rotomix* dan tidak menggunakan inkubator khusus untuk memisahkan sel pulpa yang heterogen karena keterbatasan alat dan bahan di laboratorium. Alat *rotomix* diberi termometer untuk menjaga suhu tetap 37⁰ C dan dikondisikan sedemikian rupa supaya mirip dengan keadaan yang ada di dalam tubuh sehingga *stem cell* pulpa gigi sulung dapat hidup dan berproliferasi.

Penelitian Nikolic *et al.*⁶ menggunakan enzim *colagenase* tipe I yang disuplementasi *Fetal Bovine Serum* (FBS) selama 45 menit di dalam inkubator pada tahap isolasi dan kultur *stem cell* hari pertama. Ketika *stem cell* telah mengalami proliferasi dan *confluent*. Nikolic *et al.*⁶

menggunakan enzim *trypsin* selama 10 menit dalam inkubator pada atmosfer suhu 37⁰ C dan CO₂ 5% dan diulang setiap tiga hari sekali dalam proses subkultur *stem cell*. Berbeda dengan penelitian tersebut, pada penelitian modifikasi teknik isolasi dan kultur *stem cell* pulpa gigi sulung ini menggunakan enzim *trypsin* tanpa enzim *colagenase* untuk mendapatkan sel tunggal dari pulpa gigi sulung yang heterogen. Enzim *trypsin* adalah enzim yang harganya lebih murah, tersedia dalam jumlah banyak dan mudah didapat di laboratorium. Penggunaan enzim *trypsin* diharapkan dapat menggantikan enzim *colagenase* dengan kualitas yang tidak jauh berbeda sehingga *stem cell* pulpa gigi sulung dapat berproliferasi.

Keberhasilan proliferasi dari *stem cell* pulpa gigi sulung pada penelitian ini dipengaruhi oleh dua faktor, yaitu faktor internal dan faktor eksternal. Faktor internal terdiri dari *growth factor* yang berperan dalam memicu terjadinya siklus sel dan nutrisi didalam sel. Faktor eksternal terdiri dari modifikasi teknik kultur, modifikasi teknik isolasi, media, faktor kontaminasi dan suhu. Media kultur yang digunakan adalah media standar dengan suplemen untuk menunjang proliferasi sel, antibiotik untuk mengatasi kontaminasi dan serum baik dari *fetal bovine serum* (FBS) maupun *fetal calf serum* (FCS). Implikasinya, kultur sel *in vitro* harus mampu meniru kondisi yang terjadi secara *in vivo* untuk memastikan validitas peristiwa di laboratorium semirip mungkin dengan yang terjadi di dalam tubuh termasuk diantaranya adalah suhu.^{9,11}

Pada penelitian ini, kelima faktor eksternal dapat dilakukan dengan baik dan memenuhi syarat sehingga sel yang ditanam di dalam *dish* mengalami perlekatan. Setelah sel mengalami perlekatan yang baik, maka satu sel dengan sel yang lain akan melakukan interaksi sehingga terjadilah komunikasi antar sel yang dilanjutkan dengan adanya migrasi sel dimana sel-sel tersebut akan saling mendekat dan berikatan satu sama lain. Hasil dari ikatan sel tersebut akan menimbulkan sel baru dan memperbanyak diri sehingga jumlah sel pulpa mengalami peningkatan dan disebut sel berhasil melakukan proliferasi.

Pulpa yang telah berproliferasi mengandung berbagai populasi sel yang bersifat heterogen sehingga diperlukan karakterisasi untuk menguji bahwa pulpa yang diisolasi dan dikultur dengan modifikasi teknik mengandung *stem cells from human exfoliated deciduous* (SHED). SHED merupakan salah satu jenis *mesenchymal stem cell*. Karakterisasi *mesenchymal stem cell* dilakukan dengan menggunakan teknik *direct cytochemistry-one staining* melalui *marker* CD105 sebagai kontrol positif dan CD45 sebagai kontrol negatif.^{7,12}

Uji karakterisasi pulpa gigi sulung yang diisolasi dan dikultur dengan modifikasi positif mengandung populasi SHED. Hal ini dapat diketahui melalui ekspresi positif kuat *marker* CD105 yaitu adanya fluoresensi atau pendar cahaya berwarna hijau dilihat melalui mikroskop dengan pembesaran 200x. Fluoresensi atau pendar cahaya berwarna hijau ini disebabkan karena adanya reaksi antara

antibodi 43A3 dan CD105, sebuah 180 kDa glikoprotein pada permukaan sel yang merupakan disulfida bonded homodimer dari 90 kDa tipe I transmembran subunit.^{7,11}

Karakterisasi pulpa gigi sulung yang diisolasi dan dikultur dengan modifikasi teknik mengandung SHED dan bukan sel lain ditunjukkan melalui ekspresi negatif *marker* CD45 pada saat penelitian *in vitro*. Setelah sel pulpa gigi sulung diberi perlakuan terhadap *marker* antibodi CD45 tidak terjadi pembentukan pendar cahaya atau fluoresensi. Hal ini terjadi karena tidak adanya reaksi antara HI30 antibodi dan semua isoform CD45, suatu tipe I transmembran glikoprotein yang diekspresikan pada permukaan sel.⁸

Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous (SHED) yang positif terhadap *marker* CD105 dan negatif terhadap *marker* CD45 pada hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian yang dilakukan Nikolic *et al.*⁶ Hal ini dikarenakan SHED merupakan jenis *mesenchymal stem cell* yang dapat diuji karakterisasinya dengan menggunakan *marker* CD105 sebagai kontrol positif. *Marker* CD45 merupakan kontrol negatif yang berfungsi untuk menguji bahwa SHED hasil penelitian bukan berasal dari jenis *hematopoietic cells* dan sel lain yang terdapat di dalam pulpa gigi sulung.^{8,11} Hasil penelitian menunjukkan bahwa SHED yang dikultur dan diisolasi dengan modifikasi enzim *trypsin* positif dikarakterisasi dengan *marker* CD105.

DAFTAR PUSTAKA

1. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *J Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(10): 5807-12.
2. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *J Orthod Craniofac Res* 2005; 8(3): 191-9.
3. Torneck DC, Torabinejad M. Biologi jaringan pulpa gigi dan jaringan periradikuler. Dalam: Walton RE, Torbinejad M, eds. Prinsip dan praktik ilmu endodonsia. 3rded. Sumawinata N. Jakarta: EGC; 2003. h. 4-15.
4. Peneva, Mitev V, Ishketiev N. Isolation of mesenchymal stem cells from the pulp of deciduous teeth. *Journal of IMAB-Annual Proceeding* 2008; 2: 84-7.
5. Brandon P, Xiaohua Z, Yang FC, Gabriel M, Erik J, Goebel WS. Collection, cryopreservation and characterization of human dental pulp derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *J Tissue Engineering* 2008; 2: 14.
6. Kristic N, Mojsilovic T, Kocic J, Santibanez JZ, Jovcic G, Bugarski D. Mesenchymal stem cell properties of dental pulp cells from deciduous teeth. *J Arch Bio Sce Belgrade* 2011; 63(4): 933-42.
7. Orciani M, Mariggio MA, Morabito C, Di BG, Di Primirio R. Functional characterization of calcium-signaling pathways of human skinderived mesenchymal stem cells. *Skin Pharmacol Physiol* 2010; 23(3): 124-32.
8. Shoham S; Kollet O, Lapid K, Schajnovitz A, Goichberg P, Kalinkovich A, Shezen E, Tesio M, Netzer N, Petit I, Sharir A, Lapidot T. CD45 regulates retention, motility, and numbers of hematopoietic progenitors, and affects osteoclast remodeling of metaphyseal trabecules. *J Experimental Medicine* 2008; 205(10): 2381-95.
9. Prayogo R, Wijaya MT. Kultur dan potensi stem cell dari darah tali pusat. *Cermin Dunia Kedokteran* 2006; 153: 26-8.
10. Kern S, Eichler H, Stoeve J. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24: 1294-301.
11. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *J Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 95(5): 209-14.
12. Yu G, Wu X, Dietrich MA, Polk P, Scott LK, Ptitsyn AA, Gimble JM. Yield and characterization of subcutaneous human adipose-derived stem cells by flow cytometric and adipogenic mRNA analyzes. *Cytotherapy* 2010; 12(4): 538-46.